

АНОТАЦИЯ НА МАТЕРИАЛИТЕ

по чл. 65 (1) от Правилника за РАС на ПУ “Паисий Хилендарски”, включително самооценка на приносите чл. 66(2) т.8

на доц. д-р Галина Тенева Яхубян

катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология”,
Биологически факултет, ПУ “Паисий Хилендарски”

представени за участие в конкурса за заемане на академичната длъжност “професор”,
обявен в Държавен вестник, бр.32 от 22.04.2016 г.

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление:

4.3. Биологически науки

Научна специалност:

Молекулярна биология – Регулация на генната експресия

Публикации с импакт фактор

B-1 Naydenov M., Baev V., Apostolova E., Gospodinova N., Sablok G., Gozmanova M. and Yahubyan G. (2015) High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 87: 102-108 (IF - 2.75)

Abstract: Along with its essential role in the maintenance of genome integrity, DNA methylation takes part in regulation of genes which are important for plant development and stress response. In plants, DNA methylation process can be directed by small RNAs in process known as RNA-directed DNA methylation (RdDM) involving two plant-specific RNA polymerases e PolIV and PolV. The aim of the present study was to investigate the effect of heat stress on the expression of genes encoding key players in DNA methylation e DNA methyltransferase (MET1, CMT3, and DRM2), the largest subunits of PolIV and PolV (NRPD1 and NRPE1 respectively) and the DNA demethylase ROS1. We also examined the high-temperature effect on two protein-coding genes At3g50770 and At5g43260 whose promoters contain transposon insertions and are affected by DNA-methylation, as well as on the AtSN1, a SINE-like retrotransposon. To assess the involvement of PolIV and PolV in heat stress response, the promoter methylation status and transcript levels of these genes were compared between wild type and double mutant lacking NRPD1 and NRPE1. The results demonstrate coordinated up-regulation of the DRM2, NRPD1 and NRPE1 in response to high temperature and suggest that PolIV and/or PolV might be required for the induction of DRM2 expression under heat stress. The ROS1 expression was confirmed to be suppressed in the mutant lacking active PolIV and PolV that might be a consequence of abolished DNA methylation. The increased expression of At3g50770 in response to elevated temperature correlated with reduced promoter DNA methylation, while the stress response of At5g43260 did not show inverse correlation between promoter methylation and gene expression. Our results also imply that PolIV and/or PolV could regulate gene expression under stress conditions not only through RdDM but also by acting in other regulatory processes.

B-2 Sablok G., Padma Raju G. V., Mudunuri S.B., Prabha R., Singh D.P., Baev V., Yahubyan G., Ralph P.J. and La Porta N. (2015) ChloroMitoSSRDB 2.00: more genomes, more repeats, unifying SSRs search patterns and on-the-fly repeat detection. *Database - The Journal of Biological Databases and Curation* 1-10 (IF - 3,37)

Abstract: Organelle genomes evolve rapidly as compared with nuclear genomes and have been widely used for developing microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) markers for delineating phylogenomics. In our previous reports, we have established the largest repository of organelle SSRs, ChloroMitoSSRDB, which provides access to 2161 organelle genomes (1982 mitochondrial and 179 chloroplast genomes) with a total of 5838 perfect chloroplast SSRs, 37 297 imperfect chloroplast SSRs, 5898 perfect mitochondrial SSRs and 50 355 imperfect mitochondrial SSRs across organelle genomes. In the present research, we have updated ChloroMitoSSRDB by systematically analyzing and adding additional 191 chloroplast and 2102 mitochondrial genomes. With the recent update, ChloroMitoSSRDB 2.00 provides access to a total of 4454 organelle genomes displaying a total of 40 653 IMEx

Perfect SSRs (11 802 Chloroplast Perfect SSRs and 28 851 Mitochondria Perfect SSRs), 275 981 IMEx Imperfect SSRs (78 972 Chloroplast Imperfect SSRs and 197 009 Mitochondria Imperfect SSRs), 35 250 MISA (MIcroSATellite identification tool) Perfect SSRs and 3211 MISA Compound SSRs and associated information such as location of the repeats (coding and non-coding), size of repeat, motif and length polymorphism, and primer pairs. Additionally, we have integrated and made available several in silico SSRs mining tools through a unified web-portal for in silico repeat mining for assembled organelle genomes and from next generation sequencing reads. ChloroMitoSSRDB 2.00 allows the end user to perform multiple SSRs searches and easy browsing through the SSRs using two repeat algorithms and provide primer pair information for identified SSRs for evolutionary genomics.

B-3 Baev V., Ivan Milev I., Naydenov M., Vachev T., Apostolova E., Nikolay Mehterov, Gozmanva M., Minkov G., Sablok G. and [Yahubyan G.](#) (2014) Insight into small RNA abundance and expression in high- and low-temperature stress response using deep sequencing in *Arabidopsis*. ***Plant Physiology and Biochemistry* 84: 105-114 (IF – 2,78)**

Abstract: Small RNA profiling and assessing its dependence on changing environmental factors have expanded our understanding of the transcriptional and post-transcriptional regulation of plant stress responses. Insufficient data have been documented earlier to depict the profiling of small RNA classes in temperature-associated stress which has a wide implication for climate change biology. In the present study, we report a comparative assessment of the genome-wide profiling of small RNAs in *Arabidopsis thaliana* using two conditional responses, induced by high- and low-temperature. Genome-wide profiling of small RNAs revealed an abundance of 21 nt small RNAs at low temperature, while high temperature showed an abundance of 21 nt and 24 nt small RNAs. The two temperature treatments altered the expression of a specific subset of mature miRNAs and displayed differential expression of a number of miRNA isoforms (isomiRs). Comparative analysis demonstrated that a large number of protein-coding genes can give rise to differentially expressed small RNAs following temperature shifts. Low temperature caused accumulation of small RNAs, corresponding to the sense strand of a number of cold-responsive genes. In contrast, high temperature stimulated the production of small RNAs of both polarities from genes encoding functionally diverse proteins.

B-4 Ivanova D., Vachev T., Minkov G., [Yahubyan G.](#), Zahmanova G., Naimov N. and Gozmanova M. (2014) Expression changes of MYB1 and AGO genes upon Potato Spindle Tuber Viroid infection of *Phelipanche ramosa* L. ***Comptes rendus de la Académie bulgare des sciences* 67 (6): 809-814 (IF – 0,21)**

Abstract: *Phelipanche ramosa* (*P. ramosa*) is a holoparasitic plant that attaches to the roots of many crops. Previously, we showed that *P. ramosa* can be successfully infected by Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd). Currently only few *P. ramosa* specific genes are annotated in NCBI database. Of them, we selected MYB1 and ACO as components of the gibberellin signalling and ethylene biosynthesis, respectively, to explore their expression upon PSTVd infection. qRT-PCR analysis revealed altered expression levels of MYB1 and AGO transcripts in the infected *P. ramosa* compared to

the mock, and thus we suggested that PSTVd infection affects those two hormone pathways.

B-5 Vachev T., Ivanova D., [Yahubyan G.](#), Naimov S., Minkov I. and M. Gozmanova (2014) Detection of Potato spindle tuber viroid sequence variants derived from PSTVd-infected *Phelipanche ramosa* in flower organs of tomato plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28 (3): 402-407 (IF – 0.62)

Abstract: Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is an infectious small, circular, non-coding single-stranded RNA that induces disease on many crop species, ornamental plants, weeds and parasitic plants. PSTVd propagate in their host as a population of closely related but non-identical RNA variants referred to as quasispecies. Recently, we have described three de novo arising PSTVd variants in the parasitic plant *Phelipanche ramosa* after mechanical inoculation with the PSTVd KF440-2 isolate. These *P. ramosa* derived mutants were designated as G241-C, C208-U and C227-U PSTVd variants. Each of these variants carries a single-nucleotide substitution compared to the PSTVd KF440-2 sequence from which they are considered to have evolved. Here we complement our previous studies on these mutants by exploring their potential to infect the floral organs of tomato plants. We found that the PSTVd G241-C and C208-U variants were able to replicate in systemic leaves and floral organs of tomato plants, while the PSTVd C227-U variant did not develop systemic infection. Furthermore, we analysed the progeny of these PSTVd variants in sepals and petals of tomato plants for retention of the specific mutations.

B-6 Ivanova D., Milev I., Vachev T., Baev V., [Yahubyan G.](#), Minkov G. and M. Gozmanova (2014) Small RNA analysis of Potato Spindle Tuber Viroid infected *Phelipanche ramosa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 276-282 (IF – 2,78)

Abstract: Plants defend themselves against virus/viroid infection by induction of a mechanism of viral RNA degradation or translation inhibition. This is achieved by the production of small RNAs referred to as small interfering RNAs and microRNA, the key molecules in establishment of RNA directed silencing. Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) was the first viroid species to be identified as naturally infecting potato, and it was found to infect many other crop species, wild and ornamental plants. Recently the experimental host range of PSTVd was extended with the root non-photosynthetic parasitic weed - *Phelipanche ramosa* (L) Pomel. Here we examined the small RNA population in *P. ramosa* infected with PSTVd and we observed the presence of PSTVd derived small RNAs. The hotspot regions for production of those PSTVd specific small RNAs were defined by their mapping on the viroid genome sequence. Further, we evaluated the expression levels of selected conserved microRNA families in the viroid infected *P. ramosa*. Upon infection, two members of miRNA395 family were significantly accumulated, while several members of miRNA390, miRNA396, miRNA319, miRNA166, miRNA167 and miRNA159 were strongly down-regulated. All these findings imply the involvement of various small RNA classes in the *P. ramosa* response to PSTVd infection.

B-7 Sablok G., Milev I., Minkov G., Minkov I., Varotto C, [Yahubyan G.](#) and Baev V. (2013) isomiRex: Web-based identification of microRNAs, isomiR variations and differential

expression using next-generation sequencing datasets. *FEBS Letters* 587(16): 2629-2634 (IF – 3,74)

Abstract: We present an open-access web platform isomiRex, to identify isomiRs and on the fly graphical visualization of the differentially expressed miRNAs in control as well as treated library. The open-access web-platform is not restricted only to NGS sequence dataset from animals and potentially analyzes a wider dataset for plants, animals and viral NGS dataset supporting miRBase (version 19 supporting 193 species). The platform can handle the bloated amount of the read counts and reports the annotated microRNAs from plant, animal and viral NGS datasets. isomiRex also provides an estimation of the the isomiRs, of miRNAs with higher copy number relative to their mature reference sequences indexed in miRBase (version 19 supporting 193 species). Visually enhanced graphs potentially display differentially expressed isomiRs, which will help the user to demonstrate and correlate the abundance of the isomiR as a signature event to the specific condition. An additional module for estimating the differential expression has been implemented allowing the users to postulate the differential expression across the user input samples. The developed web-platform can be accessed at <http://bioinfo1.uni-plovdiv.bg/isomiRex/>.

B-8 Apostolova E., Rashkova M., Anachkov N., Denev I., Toneva V., Minkov I. and Yahubyan G. (2012) Molecular cloning and characterization of cDNAs of the superoxide dismutase gene family in the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 85-92 (IF - 2,78)

Abstract: Resurrection plants can tolerate almost complete water loss in their vegetative parts. The superoxide dismutases (SODs) are essential enzymes of defense against the oxidative damage caused by water stress. Here, we cloned and characterized cDNAs of the SOD gene family in the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Seven full-length cDNAs, and their partial genomic clones, were obtained by combination of degenerate PCR, RT-PCR and RACE. The derived amino acid sequences exhibited a very high degree of similarity to cytosolic Cu,Zn-SODs (HrCSD2, HrCSD3), chloroplastic Cu,Zn-SODs (HrCSD5), other Cu,Zn-SODs (HrCSD4), Mn-SODs (HrMSD) and Fe-SODs (HrFSD). One cDNA turned out to be a pseudogene (HrCSD1). All identified SOD genes were found expressed at transcriptional level e the HrCSD2, HrCSD5, HrMSD and HrFSD were constitutively expressed in all organs, while the HrCSD3 and HrCSD4 were organ-specific. The transcripts of the housekeeping SOD genes were detected at significant levels even in air-dry leaves. The multigene SOD family of *H. rhodopensis* is the first studied SOD family amongst resurrection plant species. Our finding of well-expressed SOD transcripts in fully dehydrated leaves correlates with retention of SOD activity, and with the ability of *H. rhodopensis* to revive upon rehydration. Because of the endemic relict nature of that species, our findings may help to further elucidate the evolutionary relationships among different SOD isoforms from distinct plant species.

B-9 Baev V., Milev I., Naydenov M., Apostolova E., Minkov G, Minkov I. and Yahubyan G. (2011) Implementation of a *de novo* genome-wide computational approach for updating *Brachypodium* miRNAs. *Genomics* 97(5): 282-293 (IF - 3,01)

Abstract: Plant microRNAs (miRNAs) are single-stranded 20–22 nt small RNAs (sRNA) that are produced from their own genes. We have developed a de novo genome-wide approach for the computational identification of novel plant miRNAs based on the integration of the complete genome sequence with sRNA libraries. It comprises three modules - the clustering module identifies genomic regions that have two closely-located unidirectional sRNA clusters, the mirplan module explores the secondary structure of the genomic regions, and the duplex module predicts miRNA/miRNA* duplexes. We applied our approach to the *Brachypodium* genome and publicly available sRNA libraries and predicted 102 miRNAs. Our results extend the list of known miRNAs with 58 novel miRNAs and define the genomic loci of all predicted miRNAs. Because this approach considers specific features of plant miRNAs, it can be employed for the analysis of the genome and sRNA libraries generated for plant species to achieve systematic miRNA discovery.

B-10 Baev V., Naydenov M., Apostolova E., Ivanova D., Doncheva S., Minkov I. and Yahubyan G. (2010) Identification of RNA-dependent DNA-methylation regulated promoters in *Arabidopsis*. ***Plant Physiology and Biochemistry* 48(6): 393-400 (IF - 2,78)**

Abstract: RNA-dependent DNA methylation (RdDM) is an important regulatory event involved in repressive epigenetic modifications that can trigger transcriptional gene silencing (TGS). The criteria we used to pick out promoter sequences targeted by RdDM in *Arabidopsis thaliana* were the main RdDM hallmark properties: 24nt siRNAs as inducers of DNA methylation and transposable elements (TE) as one of the major targets of RdDM. Those genes whose promoters comprised overlapping sites for 24nt siRNA hits, TE and DNA methylation (siRNA/TE/Methylation overlapping regions), were defined as candidates that might be silenced by RdDM. On this basis two gene sets were created which include abiotic and biotic stress-responsive genes whose promoters may be silenced by RdDM. The DNA methylation status of the At3g50770 (CML41) promoter one of the selected candidates was experimentally assayed, and it showed dependence on the RdDM-associated Polymerase IV and Polymerase V. A publicly available 24nt siRNA-centered database called starPRO was developed that allows users easily to discover whether a particular promoter sequence is related to RdDM-associated features such as 24nt siRNA-target sites, TE, tandem repeats and DNA methylation.

B-11 Yahubyan G., Gozmanova M., Denev I., Toneva V. and Minkov I. (2009) Prompt response of superoxide dismutase and peroxidase to dehydration and rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. ***Plant Growth Regulation* 57(1): 49-56 (IF - 1,53)**

Abstract: The relic endemic nature of *Haberlea rhodopensis*, which grows in Balkan Peninsula, in combination with its high vegetative desiccation-tolerance, makes this species a good model to study mechanisms behind plant adaptation to severe drought stress. The aim of this study was to evaluate the antioxidant protection provided by Superoxide dismutase (SOD) and Peroxidase (PO) in *H. rhodopensis* after exposure to and recovery from dehydration at different developmental stages. During dehydration the electrolyte leakage from leaf tissue increased more significantly in post-flowering plants than in flowering plants, while upon subsequent rehydration this parameter showed a very fast decrease to the basic value of fresh leaves and did not depend on developmental stage. Like other

higher plant species, SOD and PO demonstrated in *H. rhodopensis* an ability to adjust their activity very promptly to changing water supply. In addition, the leaves of this resurrection species retained significant activities of SOD and PO even in air-dried state, considered as the most severe form of water stress. The enhanced activity of antioxidant enzymes may either enable the scavenging of the active oxygen species produced at very severe water deficit, and/or carry a potential for resurrection on subsequent rehydration. Upon stress treatment total activities of both enzymes were higher in flowering than post-flowering plants which reveals that developmental stage might be a factor affecting plant stress tolerance. This work identified for the first time SOD isoforms of *H. rhodopensis*. Native PAGE showed at least six multiple isoforms in the protein extract from leaf tissue of flowering plants, and the differential visualization revealed that four of them were Cu, Zn-SOD isoforms, one was Mn-SOD and one Fe-SOD. These findings provide a good starting point for future study of the SOD gene family of this rare resurrection plant at the molecular level.

Публикации, приравнени към такива с импакт фактор

B-12 Milev I., [Yahubyan G.](#), Minkov I., and Baev V.(2011) miRTour: Plant miRNA and target prediction tool. *Bioinformatics* 6(6): 248-9.

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are important negative regulators of gene expression in plant and animals, which are endogenously produced from their own genes. Computational comparative approach based on evolutionary conservation of mature miRNAs has revealed a number of orthologs of known miRNAs in different plant species. The homology-based plant miRNA discovery, followed by target prediction, comprises several steps, which have been done so far manually. Here, we present the bioinformatics pipeline miRTour which automates all the steps of miRNA similarity search, miRNA precursor selection, target prediction and annotation, each of them performed with the same set of input sequences.

B-13 Daskalova, E., Dontcheva S., [Yahubyan G.](#), Minkov I. and Toneva V. (2010) Ecological characteristics and conservation of the protected resurrection species *Haberlea Rhodopensis* Friv. as in vitro plants through a modified micropropagation system. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 24/2010/SE (Special Edition On-line), 213- 217.

Abstract: Among the especially interesting and rare plants on the Balkan Peninsula are tertiary relics and endemics belonging to the tropical family Gesneriaceae: *Haberlea rhodopensis* Friv (Rhodope silivryak, Orpheus' flower) and representatives of the genus *Ramonda*. *Haberlea rhodopensis* Friv. is included in the European list of rare, in danger of extinction and endemic plants and in the Bulgarian list of endangered plants. In recent years, our team has extended in a new direction the traditions of many years' investigations of this interesting species at the Dept. of Plant physiology and Molecular biology. We started a thorough exploration of the various habitats and ecological characteristics of *Haberlea rhodopensis* Friv. Simultaneously, at the Plant Biotechnology laboratory at the University of Plovdiv we started the establishment of a live collection of in vitro *Haberlea rhodopensis* Friv. from various populations and habitats in Bulgaria. Such in

in vitro live collection with the aim of conservation and investigation of the natural population is created for a first time in Bulgaria. This is accomplished through an in vitro system for regeneration and propagation, modified by our research group. The live collection of *in vitro Haberlea rhodopensis* Friv. plants will be a donor for conservation and reintroduction of adapted in vitro plants in their natural endangered habitats and also for physiological studies of drought tolerance, and multidisciplinary comparative analyses.

Публикации в реферирани научни списания без импакт фактор

B-14 Naydenov M., Georgieva B., Baev V. and Yahubyan G. (2015) Involvement of the transcriptional variants of histone H3.3 in the development and heat stress response of *Arabidopsis thaliana*. ***Agricultural science and technology*** 7(4):402 – 406.

Abstract: Unlike prokaryotic DNA, eukaryotic DNA is packed in a chromatin with a number of proteins, of which histones are the most important for chromatin structure and dynamics. Along with the 5 canonical histones- H2A, H2B, H3, H4 and H1 linker histone, there are many histone variants. The latter proteins play a crucial role in chromatin remodeling and gene regulation. Studies investigating the involvement of the H3 variant – H3.3 in later developmental stages and stress response of plant are few. In this work we searched available databases for histone variants of *A. thaliana* and 54 genes coding histones in *A. thaliana* were identified, 14 of them belonged to the H3 family. In order to analyze this family, multiple alignments of the corresponding amino acid sequences were performed. The gene AT4G40030 which encodes H3.3 showed 3 transcriptional variants. The expression analysis revealed that the two of variants – H3.3 (1) and H3.3 (2) were found in all overground organs, but the third one – H3.3 (3) was not detected in any of them. Semi-quantitative PCR analysis of heat-treated plants revealed that H3.3 (1) and H3.3 (2) had a higher expression compared with untreated control. These results suggest participation of these H3.3 (1) and H3.3 (2) variants in development processes and plants response to abiotic stress.

B-15 Dontcheva S., Daskalova E., Yahubyan G., Denev I., Minkov I. and Toneva V. (2009) Conservation of the protected resurrection species *Ramonda serbica* Panč. – habitat Montana district, Bulgaria as in vitro plants through a modified micropropagation system. ***Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*** 23/2009/SE (Special edition On-line), 369-372.

Abstract: *Ramonda serbica* Panč. is a rare species, Balkan endemic and tertiary relict, included in the European list of rare, in danger of extinction and endemic plants. It is also included in the Bulgarian list of endangered plants. In Bulgaria, this species has not been cultivated in vitro with the aim of conservation and investigation of the natural population. For this purpose, at the Plant Biotechnology laboratory at the University of Plovdiv we started the establishment of a live collection of in vitro *Ramonda serbica* Panč. This is accomplished through an in vitro system for regeneration and propagation, modified by our research group. The live collection of in vitro *Ramonda serbica* plants will be a donor for conservation and reintroduction of adapted in vitro plants in their natural endangered habitats and also for physiological studies of drought tolerance, and multidisciplinary comparative analyses.

B-16 Apostolova E., Krastev V., Yahubyan G., Svetleva D., Parvanova P., Mitrovska Z., Chankova S. (2014) Molecular analysis of Bulgarian common bean genotypes and their characterization after growing under rainfed and irrigated conditions, *International Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 1(4): 50-57.

*Abstract: Experiments were conducted in the field of Agricultural University in Plovdiv, Bulgaria. A standard method for cultivation in 5 replicates was applied. Biometric evaluation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) - 10 mutant lines and 10 varieties, grown under rainfed and irrigated conditions was conducted. Main traits, associated with productivity in common beans: plant height, mass of plants with pods, number of branches, height of betting on the first pod, number of fruit branches, number of pods per plant, weight of pods with seeds, number of seeds per plant, weight of seeds and average length per 10 pods, were characterized. Mutant line D 2 -0.0125 M EMS (6) has the best manifestation of the studied traits among other mutant lines and it may be included in breeding schemes for evaluation as a new cultivar. BAT 477 (20) differs significantly by its traits from other genotypes, irrespectively of the cultivation mode. RAPD and ISSR analyses were done to the studied genotypes. On the basis of molecular characterization clear allocation of genotypes was found on dendrograms built by NTSYS program. It was demonstrated that the studied Bulgarian varieties are promising germoplasme for their introduction in hybridization breeding schemes, as well as in application of mutagenesis and biotechnological approaches.*

B-17 Daskalova E., Dontcheva S., Yahoubian G., Minkov I., Toneva V. (2011) A strategy for conservation and investigation of the protected resurrection plant *Haberlea rhodopensis* Friv. *BioRisk* 6: 41-60.

*Abstract: Representatives of the resurrection plants from Gesneriaceae family are included in the Red Book of Bulgaria, in the European Register of rare, endangered, and endemic plants, and are subjects of world's conventions on the preservation of the biodiversity. The unique feature of these plants to recover from prolonged dehydration (anabiosis) is explored in numerous studies. These species are also Tertiary relics, so they could give us important knowledge about plant evolution. Our research group at the University of Plovdiv has established a national in vitro gene bank for *Haberlea rhodopensis* Friv. (25 localities) and *Ramonda serbica* Panc. (2 localities) from Bulgaria. The national gene bank is based on original and modified in vitro technologies and can serve as a conservation and biodiversity investigation center for the family Gesneriaceae. Basing on our work with *Haberlea rhodopensis* Friv., we are developing a strategy for conservation and investigation of rare and relic plant species (mapping and exploration of habitats – assessing the local risk of extinction - introducing in an in vitro gene bank - model plants for research – adaptation and possible reintroduction in endangered habitats). This strategy can be adapted and used for conservation and investigation of other rare, protected, relic and endemic plants from other re- gions of Europe and worldwide.*

B-18 Иванова Д., Въчев Т., Салим А., Яхубян Г., Минков, И., Гозманова М. (2012) Клонирание и секвениране на кДНК, кодираща Аргонавт 2 (AGO2) в паразитното растение *Orobancha ramosa*, *Юбилеен сборник, Биологически науки за по-добро бъдеще* 111-122.

Abstract: Plants have developed a mechanism known as RNA mediated silencing in order to protect themselves against exogenous RNAs such as viroids and viruses. The key step in the silencing process is processing of dsRNAs by RNase III-type nuclease homolog known in plants as dicer-like (DCL) enzyme into 21-24 nt dsRNAs (small interfering RNAs (siRNAs)), which recruited in a nuclease complex called RNA-induced silencing complex (RISC) guides recognition and cleavage of target mRNA in a sequence-specific manner. The core protein component of the RISC is a member of the Argonaute family of small RNA-guided RNA-binding proteins. AGO proteins are multidomain ribonucleases, which are evolutionary conserved and can be phylogenetically subdivided into the AGO subfamily and the PIWI subfamily. Moreover there are reports that AGO1, AGO2, and AGO7 play an antiviral role in Arabidopsis. In this study we applied RT-PCR technique to clone and sequence cDNA, coding of AGO2 in parasitic plant *O. ramosa* by using degenerative primers. Detection of AGO2 in *O. ramosa* highlighted the potential of non-photosynthetic plants to support the RNA mediated silencing mechanism.

B-19 Аначков Н., Найденов М., Баев В., Въчев Т., Гозманова М., Г. Яхубян (2012) Изследване експресията на калмодулин-подобния протеин CML41 в природни варианти на *Arabidopsis thaliana* в условия на топлинен стрес, **Юбилеен сборник, Биологически науки за по-добро бъдеще** 7-15.

Abstract: Транспозонните елементи (TE) съставят значителна част от пове-чето растителни геноми. TE могат да окажат влияние на съседни гени като изменят моделана сплайсинг и полиаденилиране или като функциони-рат като енхансери или промотори. В настоящото изследване е търсена връзка между наличието на TE в промоторната област на гена At3g50770, кодиращ калмодулин-подобен белтък CML41, и неговата експресия в раз-лични природни варианти на моделното растение *A. thaliana* при температурен стрес. PCR анализът на промотора на гена At3g50770, кодиращ CML41, в 12 природни варианта на *A. thaliana* разкрива неговата хетерогенна структура - в 10 от тях промоторът не съдържа TE, а в останалите се открива TE от клас II. Полуколичественият RT-PCR анализ на експресията на CML41 в изследваните природни варианти на *A. thaliana* не показва зависимост на нивото на транскрипция от структурата на промотора. Експресионният анализ на CML41 в природни варианта на *A. thaliana*, подложени на топлинен стрес (36°C), показва повишена експресия на транскриптите в Col0, Ws и C24. Най-вероятно CML41 взема участие не само в имунния отговор при патогенна инфекция, но и в растителния отговор на абиотични стресови фактори като повишена температура и др.

B-20 Рашкова М., Апостолова Е., Дончева С., Тонева В., Минков И., Яхубян Г. (2011) Проследяване на експресията в условия на воден стрес на гени, кодиращи изоформи на супероксид дисмутаза при родопския силивряк *Haberlea rhodopensis*. **Trav. Sci. Univ. Plovdiv, Plantarum** 41: 17-24.

Abstract: A group of vascular plants known as resurrection plants are extremely resistant to water stress. To these belongs the tertiary relict and endemic for Balkan Peninsula species *Haberlea rhodopensis* Friv. Drought stress increases significantly the formation of highly reactive oxygen species and plant respond to it by strengthening the

non-enzymatic and enzymatic antioxidative processes. In prokaryotes and eukaryotes oxidative stress induces or increases the activity of Superoxide dismutase (SOD) isoforms – metalloenzymes that have the ability to catalyze the dismutation of two peroxide radicals to H₂O₂ and O₂. In this study we have analyzed the expression of SOD genes in *Haberlea rhodopensis* Friv. Under drought conditions by semi quantitative RT-PCR. For this purpose in vitro plants were subjected to dehydration for 72 hours and 144 hours and then were rehydrated. The cDNA was amplified with gene specific primers for *CSD1*, *CSD2*, *CSD2a*, *MSD*, *FSD*. The transcript of constant expressing EF-1a gene was used as a standard for comparison the level of expression of the other transcripts. The expression of all SOD genes was increase at transcriptional level in the plants exposed to dehydration, and during the subsequent rehydration the level of expression was decreased.

Публикации в международни монографии

B-21 [Yahubyan G.](#), [Apostolova E.](#), [Minkov I.](#) and [Baev V.](#) (2014) Chapter 35: Small RNAs in Crop Response to Temperature Stress Noncoding RNAs in Plants. In: **Handbook of Plant and Crop Physiology**, Ed: Pessarakli, pp. 785-794. Cat # K15267, CRC Press, Taylor & Francis.

Abstract: Plant small RNAs, which range in size from approximately 20–30 nucleotides (nt), can be distinguished both by their biogenesis and mode of action. They include microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) such as repeat-associated siRNAs (ra-siRNAs), trans-acting siRNAs (ta-siRNAs), and natural antisense transcript siRNAs (nat-siRNAs). Each type of small RNA is unique with respect to length, the plant DICER-like (DCL) endonucleases that are involved in its biogenesis pathway, and the ARGONAUTE (AGO) proteins that are small RNA guides for target silencing. Most siRNAs target the same locus they were derived from, except for miRNAs and ta-siRNAs, which target mRNAs from different loci. All small RNA molecules may function as negative regulators of gene expression.

Учебници

B-22 **Регулация на генната експресия при еукариоти. Част I: Транскрипция и Транскрипционен контрол.** [Галина Яхубян](#), Пловдивски Университет “Паисий Хилендарски”, ISBN: 978-619-202-150-4

Учебникът разглежда процесите, които са залегнали в основата на генната експресия при еукариотните организми, както и механизмите, които я контролират за да може в крайна сметка да се формират сложните многоклетъчни организми с тяхното безкрайно разнообразие от структури и функции. В Част I се описва процеса на транскрипция с неговите особености при еукариоти, представят се регулаторните елементи и транскрипционните фактори, техните взаимодействия и ролята им във фината система за транскрипционен контрол на генната експресия.

Учебникът е предназначен за студенти, които изучават биологически науки, той може да бъде използван и от студенти по медицина, както и от студенти, обучавани в биотехнологични направления.

В-23 Молекулярна генетика. Иван Минков, Веселин Баев, Евелина Даскалова, Илия Денев, Галина Яхубян, Марияна Гозманова, Цанко Гечев., Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“. ISBN: 978-954-423-833-9

Учебникът разглежда основни аспекти в молекулярната биология и генетика. Предназначен е както за студентите от Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, така и за студенти и докторанти от други природонаучни факултети, изучаващи различни области на молекулярната генетика, епигенетиката и геномиката. Моят принос е при подготовката на раздел Епигенетичен контрол.

САМООЦЕНКА НА ПРИНОСИТЕ

Основната насока на научно-изследователската ми дейност е свързана с проучване на молекулните механизми на стресовия отговор на растенията към неблагоприятни въздействия на околната среда. Обекти на изследване са моделните растителни видове *Arabidopsis thaliana* (моделен вид за двусемеделни) и *Brachypodium distachyon* (моделен вид за едносемеделни), балканския ендемичен вид *Haberlea rhodopensis* Friv., паразитното растение синя китка. Различните растителни обекти са подлагани на абиотични стресови въздействия като високо-температурен стрес, ниско-температурен стрес или засушаване, а някои от тях са подлагани на биотичен стрес като виroidна инфекция. В изследванията са провеждани молекулярни анализ на протеин-кодиращи гени, които функционално са аотирани като свързани с растителния стресов отговор. В резултат е направена детайлна характеристика на мултигенната фамилия на Супероксид димутазата, един от ключовите ензим на антиоксидантната система, на *Haberlea rhodopensis*, като са идентифицирани всички членове на фамилията и е проследена тяхната експресия на транскрипционно и транслационно ниво в условия на стрес. При различните растителни обекти е анализирана експресионната динамика на транскрипционно ниво на стресови гени в условия на специфични стресови въздействия. Проведени са системни изследвания върху участието на растителните РНК полимерази – РНК полимераза IV и РНК полимераза V, в транскрипционния контрол на *A. thaliana*, поставен в условия на топлинен стрес. Свързано с това е търсена връзка между РНК-зависимото метилиране на промоторните области на някои гени и тяхната експресия при стресово въздействия. Особено внимание е обърнато на онези малки РНК, които имат регулаторна функция, като е изследвано тяхното структурно и функционално разнообразие и е установена връзка със стресовия отговор. Молекулните анализи са осъществени чрез прилагане на молекулярно-биолгични методи, включващи клониране, секвениране на индивидуални ДНК молекули, масово паралелно секвениране за широко-мощабни геномни анализи, конвенционален PCR и PCR в реално време. За обработка на натрупаните бази данни са прилагани редица биоинформатични пакети за анализ и са разработени нови софтуерни продукти, съобразени със специфичните цели на биологичния анализ. Приносите в детайли са представени както следва:

А. Молекулярна характеристика на мултигенното семейство на Супероксид димутазата в балканския ендемичен и реликтен вид *Haberlea rhodopensis* Friv.

Редкият растителен вид *Haberlea rhodopensis* Friv., известен като родопски силивряк или орфеево цвете, е терциерен реликт. През терциера, в условия на по-топъл и влажен климат, той е бил широко разпространен в Европа и Азия. С настъпването на кватернерните залеждания много видове загинали, а други като родопския силивряк силно разпокъсали и стеснили ареалите си, запазвайки се само на отделни места, където микроклиматичните условия показали сходство с терциерния климат. В борбата за съществуване при новите условия този вид е изработил специфични физиологични приспособления благодарение на които продължава да съществува и сега. Родопският силивряк, който е един от редките представители на възкръсващите растения на

европейския континент, притежава присъщата за тях уникална способност да преживява почти пълна дехидратация със сведена до минимум метаболитна активност (анабиоза) и след това да бъдат рехидратирана до биологически функционално състояние. Във връзка с това този вид предоставя възможност да бъде използван като моделно растение за изследване на биохимичните и молекулярни механизми, залегнали в основата на изключително високата устойчивост на засушаване. Устойчивостта на родопския силивряк на силно засушаване е обусловена от редица биохимични и физиологични особености, които са обект на системно изследване от няколко научни групи в България.

Един от ключовите ензими, участващи в стресовия отговор на растенията, е супероксид дисмутазата (СОД). За разлика от много други организми, в чиито клетъчни органели обикновено се среща само една изоформа на СОД, при растенията могат да бъдат открити множество изоформи, кодирани от повече от един ген. Вероятно появата в растителния свят на мултигенни фамилии на СОД е отражение на големия брой и голямото разнообразие от функциите, които тази група ензими изпълнява в растителния организъм, който в резултат на неподвижния начин на живот физически не е в състояние да избегне вредните фактори на околната среда. Това подтикна нашата изследователска група да проведе молекулярен анализ на мултигенното семейство на СОД в родопския силивряк.

Оригинални научни приноси:

- За първи път е проведен молекулярен анализ на мултигенната фамилия на СОД в родопския силивряк, в резултат на който са идентифицирани, клонирани и секвенирани 7 гена (в непълна дължина) и съответните кДНК (в пълна дължина).
- Фамилията на СОД в родопския силивряк е анотирана в *най-голямата световна научна база данни* - National Center for Biotechnology Information (NCBI) със следните членове: *HrCSD1*, *HrCSD2*, *HrCSD3*, *HrCSD4* и *HrCSD5* гените, кодиращи медно-цинкови изоформи, *HrFSD* гена, кодиращ желязна изоформа и *HrMSD* гена, кодиращ манганова изоформа (Приложение 3).
- Установена е екзон/интронната структура на описаните гени чрез сравняване на генните клонове и съответните им кДНК, и са дефинирани отворените рамки на четене.
- Проведен е експресионен анализ чрез PCR на седемте гена в различните органи на родопския силивряк, който установи конститутивна експресия на *HrCSD2*, *HrCSD5*, *HrMSD* и *HrFSD* гените във всички органи (следователно участие в поддържането на основната супероксид-обезвреждаща активност на растението), експресия на *HrCSD3* гена в стар розетъчен лист (най-вероятно свързан с процесите на стареене) и експресия на *HrCSD4* гена в цвят.
- Проведен е експресионен анализ чрез PCR на седемте гена в условия на дехидратация и рехидратация, който установи повишени експресионни нива на *HrCSD2*, *HrCSD5*, *HrMSD* и *HrFSD* гените в изсушените листа.

- Експресионният анализ на изоформите на СОД в лист, проведен чрез диференциална нативна гел-електрофореза, визуализира четири Cu,Zn-СОД, една Mn-СОД и една Fe-СОД изоформи.

Научно-методични приноси с потвърдителен характер:

- Модифициран е метод за *in vitro* микро-размножаване на *Haberlea rhodopensis*.

Публикации: В-8, В-11, В-13, В-15, В-17, В-20.

Б. Изследвания върху структурното и функционално разнообразие на растителните малки регулаторни РНК

При растенията малките РНК молекули варират по дължина в диапазона 20-30 нт и могат да бъдат класифицирани въз основа на тяхната биогенеза и механизъм на действие на два основни класа - микроРНК (миРНК) и малки интерфериращи РНК. Малките РНК изпълняват важни регулаторни функции чрез упражняване на негативен ефект върху генната експресия, често наричан генен сайлънсинг. Последният обхваща механизми, които водят до понижаване или пълно изключване на експресията на един или повече гени. В растенията се наблюдават два типа генен сайлънсинг – транскрипционен генен сайлънсинг, при който синтезата на РНК намалява в следствие на ДНК метилиране и/или модифициране на хроматина, което се опосредства в повечето случаи от малките интерфериращи РНК, и пост-транскрипционен генен сайлънсинг, при който миРНК могат да опосредстват разграждането на РНК или потискането на транслацията. В тази насока ние сме провеждали геномни и биоинформатични изследвания за разширяване на знанията върху структурното и функционално разнообразие на растителните малки регулаторни РНК:

Оригинални научни приноси:

- За първи път е анализирана чрез нов биоинформатичен “de novo” подход библиотека на малки РНК, създадена чрез масово паралелно секвениране, на моделния за едносемеделни растения вид *Brachypodium distachyon*. В генбанката на NCBI са анотирани 102 гена, кодиращи миРНК в генома, от които 52 кодират видово специфични миРНК (Приложение 3). Дефинирани са геномните локуси на новооткритите гени и са групирани в клъстери.
- За първи път са идентифицирани прицелни места на миРНК при *Phelipanche ramosa*, като при сравнителния анализ е използвана база данни EST ('белязани' експресирани секвенции) на *Phelipanche aegyptiaca*. С помощта на алгоритъм BLAST2 GO са анотирани 832 секвенции, които притежават прицелни места за 46 миРНК.
- Проведен е сравнителен анализ на широко-машабните профили на малките РНК класове в *Arabidopsis thaliana*, генерирани в отговор на високо- и ниско-температурен стрес. Анализът демонстрира образуването на диференциално експресирани малки РНК от голям брой белтък-кодиращи гени като ниската температура причинява натрупване на малки РНК, произхождащи от смислената

верига на много гени, функционално свързани с отговора на студ, докато високата температура повишава образуването на малки РНК, произхождащи от двете вериги на гени, кодиращи функционално разнообразни белтъци.

Оригинални научно-методични приноси:

- Разработен е нов свободно достъпен софтуер за “de novo” търсене и анотиране на миРНК в библиотеки, произведени чрез масово паралелно секвениране. За първи път са използвани самостоятелни алгоритми за трите етапа на идентифициране на растителните миРНК: алгоритъм за клъстери, алгоритъм за установяване на 2D структурата и алгоритъм за дуплекси.
- Разработен е нов свободно достъпен софтуер за анализ на изоформи на миРНК в библиотеки, създадени чрез масово паралелно секвениране. Софтуерът позволява идентифициране на изоформи на референтни миРНК, установяване на изменена експресия на миРНК и предсказаните изоформи, както визуализиране на статистически достоверната извадка от резултатите. Софтуерът поддържа референтни миРНК от 193 вида.
- Разработен е нов софтуер за автоматичен анализ на растителни EST секвенции за търсене на предшественици и прицелни места на миРНК. Софтуерът сканира едновременно група от EST секвенции за хомоложно откриване на миРНК, както и последващо установяване на техните прицелни места и гените които могат да регулират в даденият набор от данни.

Публикации: В-3, В-7, В-9, В-12, В-21.

В. Участие на растителните РНК полимерази - РНК полимераза IV и РНК полимераза V, и на контролираното от тях РНК-зависимо ДНК-метиране, в стресовия отговор на *Arabidopsis*

На транскрипционно ниво, малките интерфериращи РНК могат да индуцират епигенетични модификации на хомоложни ДНК секвенции чрез процеса на РНК-зависимо ДНК-метиране, доказан до момента само в растения. Процесът се осъществява с участието на множество ензими, сред които ключова роля имат две специфични само за растенията РНК полимерази - РНК полимерази IV и РНК полимерази V.

Натрупаните до момента знания за механизма на РНК-зависимо ДНК-метиране разкриват неговия потенциал да контролира стресовия отговор. Идентифицирани са значителен брой малки РНК, които се индуцират в условия на стрес, и поне няколко от тях се нуждаят от РНК полимераза IV за биогенезата си. Прицелни за РНК-зависимо ДНК-метиране секвенции като ретротранспозони могат да бъдат дерепресирани при различни типове стрес и да предоставят промотор/енхансерни активности на съседни гени. Микроарей анализът на мутанти по голямата субединица на РНК полимераза IV и РНК полимераза V – NRPD2 при високо-температурен стрес разкрива необходимостта от РНК-зависимо ДНК-метиране за топлинния толеранс на *Arabidopsis*. Проведените в нашата лаборатория изследвания предоставят нови доказателства за връзката на растителните РНК полимерази със стресовия отговор на растенията.

Оригинални научни приноси:

- Проведен е биоинформатичен анализ, базиран на BLAST, RepeatMasker, Tandem Repeat Finder и др. софтуерни програми, на промоторните секвенции на всички протеин-кодиращи гени и миРНК гени в *Arabidopsis thaliana* за откриване на регулаторни елементи (например места, които могат да свързват комплементарно малки РНК, или транспозонни елементи), които могат да бъдат обвързани с РНК-зависимото ДНК-метиране.
- Идентифицирани са потенциалните гени, които могат да бъдат контролирани чрез РНК-зависимо ДНК-метиране на съотв. промоторни области, от които 67 гена са функционално анотирани като свързани с отговора на биотичен стрес, 274 гена като свързани с отговора на абиотичен стрес и 19 миРНК гени.
- Установен е, чрез метилационно-чувствителен PCR, метилационния статус на промоторите на 3 гена - At3g50770 (CML41, калмодулин-подобен белтък 41), At5g43260 (CHAP, чаперон-подобен белтък) и At4g09460 (MYB68 транскрипционен фактор), които са свързани с абиотичния стресов отговор, и които са идентифицирани в биоинформатичния анализ като прицелни за РНК-зависимо ДНК-метиране.
- Доказано е участието на РНК полимераза IV и РНК полимераза V в ДНК-метирането на промоторите на *CML41* и *CHAP* чрез сравняване на див тип *Arabidopsis* и мутантни линии *nprpd1a-2* и *nprpd1b-2*, в които съответно не се образува най-голямата субединица на РНК полимераза IV (NRPD1) и на РНК полимераза V (NRPE1).
- За първи път е установена координирана експресия на РНК полимераза IV и РНК полимераза V, и *de novo* метилтрансферазата DRM2, които са свързани с метирането на ДНК в *Arabidopsis*.

Оригинални научно-методични приноси:

- За първи път (към 2010 г.) е създадена базата данни StarPro за анализ на РНК-зависимо ДНК-метиране на промоторните области на *A. thaliana*, в която са интегрирани редица типове данни като секвенции на малките интерфериращи РНК (с дължина 24 нт), транспозонни елементи, повтарящи се елементи и метиран цитозин. Базата данни съдържа информация за промоторни области на 25 516 протеин-кодиращи гени и 178 миРНК гени, 32 380 прицелни места за малки РНК, 8054 транспозонни елемента и 7805 тандемни повтори.

Научни приноси с потвърдителен характер:

- Потвърдена е координираната експресия на РНК полимераза IV, РНК полимераза V и деметиращия ензим ROS1.

Публикации: В-1, В-10, В-11, В-19.

Г. Изследване взаимодействието на вириода Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) и неговите гостоприемници – домати и синя китка

Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) е вироиден инфекциозен агент, който представлява малка пръстеновидна некодираща едно-верижна РНК молекула. Вироидът се разпространява в своите гостоприемници под формата на популации, съставени от варианти на РНК молекулата, които не са идентични, но са много подобни по между си. Той може да индуцира заболявания в множество селско-стопански култури, орнаментални растения, паразитни растения и др.

Оригинални научни приноси:

- За първи път е проведен анализ чрез масово паралелно секвениране на популацията от малки РНК, които се образуват в паразитното растение синята китка *Phelipanche ramosa* при инфекция с PSTVd. Дефинирани са „горещите региони“ във видоидния геном, от където произлизат вироид-специфичните малки РНК. Експресионният анализ на избрани фамилии консервативни миРНК установи при вироидна инфекция понижени нива на членове от фамилиите на миРНК390, миРНК396, миРНК319, миРНК166, миРНК167 и миРНК159, и повишени нива на членове от миРНК395.
- При механична инокулация на *Phelipanche ramosa* с вироиден изолат KF440-2 на PSTVd, са установени „de novo“ три вироидни варианта, чиито секвенции се различават от тази на изолата с по един нуклеотид. Два от вариантите се откриват както в системните листа, така и в цветните части на домати, към които паразитира инфектирана с PSTVd синя китка, с което се доказва придвижване на вироид-специфични малки РНК от паразитното растение към гостоприемника.
- Установена е променена експресия на гените *MYB1* (транскрипционен фактор) и *AGO* (член на фамилията на Аргонавт), които участват съответно в гиберилиновия сигнален път и в биосинтезата на етилен, при инфектиране на синя китка с PSTVd, което показва, че вироидната инфекция повлиява тези хормонални пътища.

Публикации: В-4, В-5, В-6.

Заключение: Описаните научни и научно-методични приноси откриват възможности за оптимизиране на съществуващите подходи за контролиране на растителния стресов отговор както в изследваните растителни видове, така и в други видове с важно стопанско значение. Идентифицираните белтък-кодиращи и миРНК гени могат да бъдат използвани за трансформация на растителни видове от селскостопанска значимост с презумпцията, че това би подобрило тяхната устойчивост и продуктивност в райони, изпитващи недостиг на вода или подложени на високи температури. Разработените биоинформатични програми могат да бъдат надстройвани за да отговорят на специфичните нужди при анализиране на непрекъснато нарастващите бази данни на малки РНК от различни растителни видове.

Изготвил:
(доц. д-р Галина Яхубян)